

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 356—360, Juli 1969

Vollautomatische enzymatische Bestimmung des freien Glycerins im Blut mit dem AutoAnalyzer

Von U. HARDING unter Mitarbeit von G. HEINZEL

Aus den Biochemischen Forschungslaboratorien der Firma Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach/Riß

(Eingegangen am 7. März 1969)

Es wird ein Verfahren zur vollautomatischen Bestimmung des freien Glycerins im Vollblut mit dem Technicon AutoAnalyzer beschrieben. Es beruht auf der von O. WIELAND angegebenen enzymatischen Methode. Unter Verwendung von 100 μ l bzw. 200 μ l-Blutproben können 60 Bestimmungen in der Stunde durchgeführt werden. Dabei werden mindestens noch 0,2 bzw. 0,1 mg/100 ml Glycerin einwandfrei erfaßt. Andere Blutbestandteile stören nicht. Meßgenauigkeit, Wiederfindungsrate und Vergleich mit der manuellen Methode werden angegeben.

The fully automated determination of free glycerol in blood with the AutoAnalyzer

A fully automated method is described for the measurement of free glycerol in whole blood with the Technicon AutoAnalyzer. It is based on the enzymic determination of glycerol according to O. WIELAND. Using 100 μ l or 200 μ l blood samples, 60 determinations per hour are possible. Values as low as 0.2 or 0.1 mg/100 ml glycerol respectively may be easily measured. Other blood components do not interfere. The accuracy, the recovery and a comparison with the manual method are given.

Zu den wichtigsten Metaboliten des Fettstoffwechsels gehört neben freien Fettsäuren, Triglyceriden und Ketonkörpern auch das freie Glycerin, ein Mobilisationsprodukt der Lipolyse (1). Bei in vitro-Versuchen ist das abgegebene Glycerin ein zuverlässiges Maß für die Lipolyserate (2).

Zur Messung des Glycerins in Blut oder Inkubationsmedien werden empfindliche, spezifische und leicht zu handhabende Methoden benötigt. Die bekannten photometrischen und fluorimetrischen Verfahren (3—11) sind meist zu wenig spezifisch. Dagegen sind gute enzymatische Bestimmungsmethoden bekannt (12—19). Die Bewältigung einer großen Zahl anfallender Proben erfordert weitgehende Automatisierung. Für das System des Technicon AutoAnalyzers ist bisher jedoch noch keine Möglichkeit zur Messung der geringen Blutkonzentrationen an Glycerin (Normalbereich bei Ratten nach unseren Messungen 0,5—4,0 mg/100 ml je nach Dauer der Nahrungskarenz) bekannt. Es liegen lediglich semiautomatische Verfahren zur Bestimmung der Triglyceride vor, in deren Endphase Glycerin fluorimetrisch (20) oder kolorimetrisch (21) gemessen wird. Eine enzymatische Methode nach ANTONIS (22) wird auch nur für Glycerid-Glycerin angegeben.

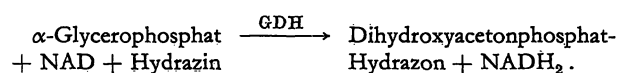
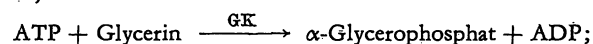
Wir möchten im folgenden eine vollautomatische Bestimmung des freien Glycerins aus Vollblut am AutoAnalyzer vorschlagen, die auf der Basis der Methode von O. WIELAND (12) ausgearbeitet wurde und sehr einfach durchführbar ist.

Methodik

Prinzip

Die zu messenden Blutproben werden mit NaCl-Lösung verdünnt in den AutoAnalyzer gegeben und durch Dialyse gegen NaCl enteiweißt, wobei 50% des Glycerins in die zur Messung gehende NaCl-Lösung diffundiert. Das Dialysat wird dann mit

Reaktionsgemisch vereinigt, wobei folgende Umsetzungen stattfinden¹⁾:



Das NADH₂ ist der phosphorylierten Glycerinmenge äquimolar und wird fluorimetrisch gemessen. Die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat wird durch das Hydrazin verhindert.

Reagenzien und Lösungen

Reagenzien

NaCl p. a. (Merck, 6406)
Tween 20 (Schuchardt, TW 125)
L-Glycin (Merck, 4200)
Hydrazinhydrat (Merck 4604)
KOH p. a. (Merck 5033)
MgCl₂ · 6 H₂O p. a. (Merck 5833)
ATP (Boehringer Mannheim, 15028 NAAH)
NAD (Boehringer Mannheim, 15300 CNAH)
GK (Boehringer Mannheim, 15746 EGAP)
GDH (Boehringer Mannheim, 15135 EGAQ)
Glycerin p. a. (Merck, 4094)

Verdünnungslösung

0,9proz. NaCl-Lösung + 0,5 ml/l Tween 20. Pro Liter wird eine kleine Spatelspitze Phenol zugegeben.

Reaktionsgemisch

Diese Lösung muß unbedingt täglich neu angesetzt werden. Es empfiehlt sich, zunächst zu einem aliquoten Teil die beiden Enzyme zuzugeben, den beschriebenen Vorversuch zu machen und dann erst die Gesamtlösung mit den Enzymen zu vereinigen.

9 g Glycin + 124,8 g Hydrazinhydrat mit 1 N KOH auf pH 9,8 einstellen, danach 240 mg MgCl₂ · 6 H₂O, 500 mg ATP und 225 mg NAD zugeben und mit bidest. Wasser auf 600 ml auffüllen. Anschließend mit 20 mg GDH, 2 mg GK und einigen Tropfen Tween 20 versetzen und gut schütteln.

¹⁾ Die Abkürzung GK (Glycerokinase) wird hier gebraucht für ATP: Glycerin Phosphotransferase (EC 2.7.1.30) und GDH (Glycerinphosphatdehydrogenase) für L-Glycerin-3-phosphat: NAD Oxydoreduktase (EC 1.1.1.8).

Glycerinstandards

Einwiegen von Glycerin und Auffüllen mit bidest. Wasser in folgenden Konzentrationen: 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 10 mg/100 ml. Auch hier wird pro Liter eine kleine Spatelspitze Phenol zugesetzt. Die Lösungen sind im Kühlschrank 4 Wochen unverändert haltbar.

Geräte

Als Meßgerät dient der Technicon AutoAnalyzer (Standardausführung) mit Probennehmer II (Nockenscheibe 1:1 für 60 Proben pro Std.), Proportionierpumpe, Dialysator (37°), Doppelheizbad, Tygon-Schläuchen, Durchflußfluorimeter und Linien-schreiber. Anregungsfilter 360 nm (Technicon), Emmissionsfilter 460 nm (Schott und Gen., Mainz). Probenbecher aus Glas oder Polyäthylen, da Polystyrenbecher von Technicon nicht geeignet sind. Gut bewährt haben sich bei uns auch Probenbecher der Firma AS-Nunc (Algade 8, Roskilde, Dänemark).

Verdünnung der Blutproben erfolgt mit Citopipetten der Fa. E. Bühler, Tübingen, die Durchmischung mit Rührstab (3350) der Firma Eppendorf Gerätebau.

Der Vorversuch und die zum Vergleich herangezogene manuelle Bestimmung des Glycerins nach WIELAND (12) wurde an einem Eppendorf-Photometer (1101 M), Filter 334 nm, mit Kompensationsschreiber (4412) und Trafostufe (1853), die auf den Registrierbereich 0–0,25 eingestellt war, mit Halbmikro-Quarzküvetten (20 mm Lichtweg) bzw. mit 10 mm Quarzküvetten beim Vorversuch, ausgeführt.

Ausführung

Aufbau und Arbeitsweise der AutoAnalyzer-Anlage ergeben sich aus Abbildung 1. Zur Inbetriebnahme wird die Apparatur zu-

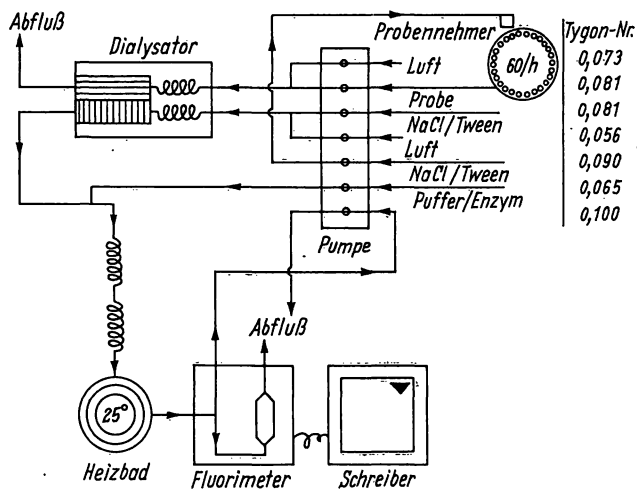


Abb. 1

Blut-Glycerin-Bestimmung im AutoAnalyzer, Fließ-Schema. Die Weiten der Tygonschläuche in der Proportionierpumpe sind nach dem Technicon-Datenblatt für Schlauchgrößen angegeben

nächst 30 Min. nur mit der Verdünnungslösung durchspült und weitere 30 Min. mit Verdünnungs- und Reaktionsgemisch. Danach wird die Basislinie eingestellt (Schreiberausschlag 3–5%), deren Verlauf erst nach dieser Zeit konstant wird.

Vorversuch

Daneben führen wir stets einen einfachen Vorversuch durch, mit dem die Brauchbarkeit der Reaktionslösung und der ausreichende Gehalt an Enzymen kontrolliert wird. 3,2 ml des Reaktionsgemisches ohne Enzyme werden mit 5 ml Verdünnungslösung versetzt. 2 ml dieser Mischung werden mit 100 µl Glycerin (2mg/100 ml) und 25 µl GDH vereinigt. Nach Eintritt einer konstanten Nulleinstellung am Eppendorf-Photometer wird die Reaktion mit 5 µl GK gestartet. Läuft die Reaktion ordnungsgemäß ab, ergibt sich der Kurvenverlauf A der Abbildung 2. Ist die Enzymmenge zu gering oder das Reaktionsgemisch unbrauchbar (In-

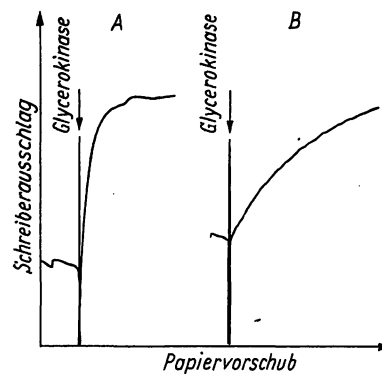


Abb. 2

Vorversuche zur Prüfung der Brauchbarkeit des Reaktionsgemisches für die automatische Glycerinbestimmung. Eppendorf-Photometer, Papiervorschub des Schreibers 3 cm/Min. Geeignetes (A) und ungeeignetes Reaktionsgemisch (B)

stabilität und Sauberkeit des Hydrazins, pH), dagegen der Kurvenverlauf B oder gar keine Reaktion. In diesem Fall werden nochmals 10 µl GDH (entsprechend 3,5 mg auf 600 ml Lösung) zugesetzt. Bringt dies keine Verbesserung, so ist das Reaktionsgemisch neu anzusetzen.

Durchführung der Bestimmung

100 µl des zu untersuchenden Blutes bzw. der Standardlösungen werden in den Probenbechern mit jeweils 1,25 ml Verdünnungslösung versetzt, gut gemischt und in den Probennehmer eingesetzt. Zu Beginn jeder Versuchsreihe werden je 2–3 Proben von 2 verschiedenen Standards (2 und 3 mg/100 ml) gemessen, wobei die Fluorimeterempfindlichkeit so eingestellt werden sollte, daß der Schreiberausschlag bei 2 mg/100 ml etwa 40–50% beträgt. 2 weitere Standardproben werden nach je 40 Messungen bestimmt.

Die Entnahme am Probennehmer erfolgt mit einer Rate von 60 pro Std., wobei nach Transport durch die Pumpe mit Luft segmentiert wird. Beim Dialysieren (37°) gegen Verdünnungslösung (ebenfalls durch Luft segmentiert) gelangen 50% der Glycerinmenge in das weitere Analysensystem, wo sie mit dem Reaktionsgemisch vereinigt werden. Nach Durchgang durch 2 Doppelmixspiralen und den Thermostaten (Heizbad 25°) erfolgt Messung im Fluorimeter. Ausgewertet wird mit der Universalsschablone durch Aufstellung einer Eichkurve.

Die im Experiment gewonnenen Blutproben müssen nicht sofort der Messung zugeleitet werden. Versuche bei Raumtemperatur und bei 2° im Kühlschrank haben gezeigt, daß in jedem Fall die bis zu 5 Std. nach der Entnahme gemessenen Glycerinkonzentrationen gleich bleiben.

Die manuellen Vergleichsmessungen wurden nach der Vorschrift von O. WIELAND (12) durchgeführt, wobei die Enzymkonzentrationen 2 mg/10 ml bei GDH und 10 µl GK pro Probe betrugen. Die Umsatzrate wurde am Eppendorf-Schreiber nach Stillstand der Reaktion abgelesen.

Charakteristik der Methode

Zur technischen Durchführung

Um zu prüfen, ob bei der in Anwendung kommenden Dialyse gegen die gleiche Verdünnungslösung tatsächlich ein konstanter Anteil an Glycerin gemessen wird, wurde mit Standardlösungen verschiedener Konzentrationen ein Umpolungsversuch gemacht. Dazu wurde der Probenzulauf nach Abbildung 1 mit dem Zufluß von NaCl + Tween vertauscht und die aufgezeichneten Meßwerte mit denen der normalen Dialyse verglichen. Tabelle 1 zeigt, daß bei den verwendeten Einwaage-Konzentrationen der Schreiberausschlag in

Tab. 1
Bestimmung der Eliminierungsrate von Glycerin bei der Dialyse von Standardlösungen am AutoAnalyzer. Jede Angabe ist der Mittelwert aus 4 Messungen

eingewogene Konzentration des Standards [mg/100 ml]	gemessene Glycerinkonzentration in Skalenteilen am Schreiber	
	normale Dialyse	umgepolte Dialyse
1	15,5	15,0
2	30,5	31,5
3	44,0	44,0
4	58,5	60,0
5	76,0	74,0

beiden Fällen identisch ist, d. h. bei der Dialyse 50% des Glycerins der Analyse zugeführt werden und 50% verlorengehen.

Um die Eigenfluoreszenz der Proben zu messen, wurde Blut gegen folgende Lösungen dialysiert: a) Verdünnungslösung, b) Reaktionsgemisch ohne GDH, c) Reaktionsgemisch ohne GK. In keinem Fall trat eine

meßbare Fluoreszenz auf. Dies zeigt, daß die Bestimmung bei den angegebenen Wellenlängen durch andere Blutbestandteile nicht gestört wird.

Unter den gewählten Bedingungen sind die Schreiber-ausschläge bei den für die Blutmessungen wichtigen Konzentrationen streng proportional der Glycerinmenge, wie es die Messung verschiedener Standards zeigt (Abb. 3).

Präzision, Empfindlichkeit

Meßgenauigkeit

Zur Überprüfung der Meßgenauigkeit wurden Glycerinstandards (Einwaage-Konzentration 2 mg/100 ml bei Versuch 1—5 und 4 mg/100 ml bei Versuch 6, Tab. 2) zu verschiedenen Zeiten unter völlig gleichen Bedingungen gemessen. Von jeder Probe wurden 10 Meßwerte ermittelt und der mittlere Fehler des Mittelwertes ($S_{\bar{x}}$) berechnet (Tab. 2). Er beträgt im Durchschnitt 0,01—0,02 mg/100 ml.

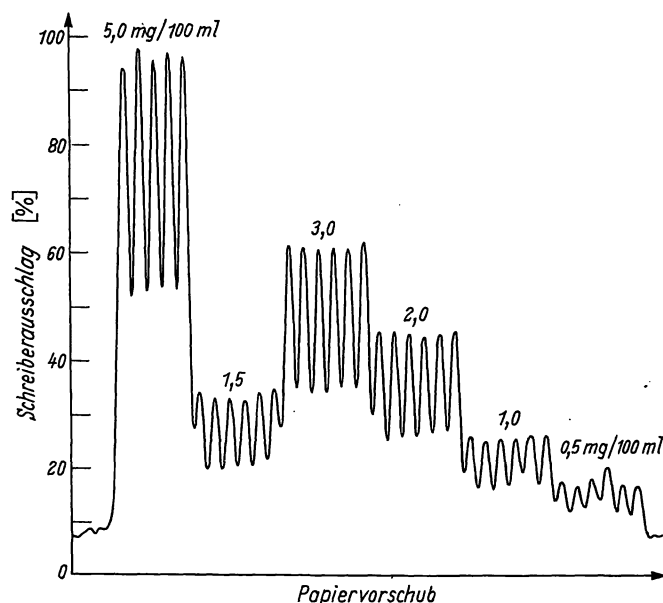


Abb. 3
AutoAnalyzer-Diagramm zum Nachweis der Beziehung zwischen Glycerinkonzentration und Fluoreszenz. Mehrfachmessung verschiedener Standardlösungen im Bereich von 0,5—5,0 mg/100 ml

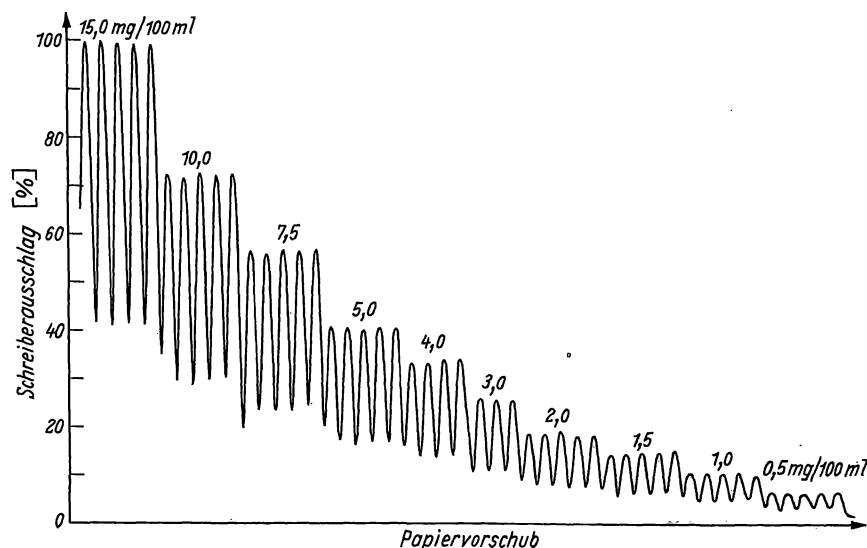


Abb. 4
AutoAnalyzer-Diagramm zum Nachweis der Beziehung zwischen Glycerinkonzentration und Fluoreszenz. Mehrfachmessung verschiedener Standardlösungen im Bereich 0,5—15 mg/100 ml

Tab. 2
Prüfung der Meßgenauigkeit der Glycerinbestimmung am AutoAnalyzer mit Hilfe von Standardlösungen. Angaben in mg/100 ml. \bar{x} = Mittelwert, $S_{\bar{x}}$ = mittlerer Fehler des Mittelwertes. Versuch 1—5: Einwaage-Konz. 2 mg/100 ml, Versuch 6: Einwaage-Konz. 4 mg/100 ml

Versuch	1	2	3	4	5	6
x	1,94	1,98	2,03	2,00	1,95	4,00
	1,90	2,00	2,05	1,95	1,95	4,05
	1,96	2,01	2,02	2,03	2,00	3,90
	1,96	2,00	2,02	2,03	1,95	3,90
	1,98	1,96	2,00	2,00	2,00	4,10
	2,02	1,98	2,05	2,00	1,95	4,00
	2,00	2,00	2,06	2,07	1,95	4,05
	2,00	2,02	2,00	2,00	1,95	3,95
	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
	2,00	2,00	2,08	2,03	2,00	4,05
\bar{x}	1,98	2,00	2,03	2,01	1,97	4,00
$S_{\bar{x}}$	0,025	0,012	0,020	0,022	0,018	0,015

Meßbereich

Aus Abbildung 3 ist ersichtlich, daß bei Verwendung von 100 μ l-Proben der Schreiber-ausschlag bei 2 mg/100 ml von der Basislinie an gerechnet 40% beträgt.

Ohne Verschlechterung der Grundlinie ist es jedoch auch möglich, den Ausschlag auf 50% auszudehnen. Die noch gut erfaßbaren Ausschläge von 5% bedeuten dann 0,2 mg/100 ml Glycerin, bei Verwendung von 200 μ l Blut 0,1 mg/100 ml Glycerin als untere, meßbare Konzentration. Nach Abbildung 3 ist ebenfalls mit 100 μ l-Proben ohne Veränderung der Fluorimeter-einstellung und der Enzymmengen die obere Meßgrenze 5 mg/100 ml, nach Neueinstellung des Meßgeräts (Reduzierung der Empfindlichkeit) 15 mg/100 ml (Abb. 4).

Wiederfindungsrate

5 ml Rattenblut wurden mit 155 ml Verdünnungslösung verdünnt und 1,25 ml dieser Mischung in Probenbechern entweder mit 50 μ l Verdünnungslösung oder 50 μ l Glycerinlösung verschiedener Konzentration, deren Gehalt zur Kontrolle ebenfalls mitgemessen wurde, versetzt (Tab. 3). Die eingesetzten Glycerinmengen wurden vollständig wiedergefunden.

Tab. 3

Messung der Wiederfindungsrate bei Glycerinbestimmungen am AutoAnalyzer durch Zugabe verschiedener Mengen zu Blutproben. Die Angaben sind Mittelwerte aus je 4 Bestimmungen. S_x = mittlerer Fehler des Mittelwertes

Glycerinkonzentration in mg/100 ml Blutprobe	zugesetztes Glycerin	S_x Blut + Glycerin	% Wiederfindung
2,00 \pm 0,07	0,50 \pm 0,04	2,55 \pm 0,03	102,5
1,90 \pm 0,05	1,00 \pm 0,03	2,90 \pm 0,04	100
1,95 \pm 0,05	1,90 \pm 0,03	3,90 \pm 0,05	99
1,85 \pm 0,03	2,90 \pm 0,05	4,75 \pm 0,05	100
1,95 \pm 0,05	4,00 \pm 0,04	5,75 \pm 0,03	97
2,00 \pm 0,05	4,90 \pm 0,04	6,80 \pm 0,08	98,5

Vergleich zwischen manueller und automatischer Messung

Es wurde ein Vergleich zwischen der AutoAnalyzer-methode und der manuellen Bestimmung durchgeführt. Dazu wurde aus dem Serum von 8 Ratten (Probenmenge bei manueller Bestimmung 200 μ l) der Glycerinegehalt bestimmt (Tab. 4). Die durchschnitt-

Tab. 4

Vergleich der Meßdaten im Ratten Serum bei der enzymatischen Glycerinbestimmung zwischen Handmethode und AutoAnalyzer. Die Angaben sind Mittelwerte in mg/100 ml aus 5 Messungen. S_x = mittlerer Fehler des Mittelwertes

Tier	AutoAnalyzer	Handmethode	% Abweichung
1	1,39 \pm 0,02	1,26 \pm 0,09	+2,0
2	1,50 \pm 0,025	1,50 \pm 0,09	0
3	1,21 \pm 0,04	1,19 \pm 0,04	+1,65
4	0,67 \pm 0,03	0,64 \pm 0,02	+4,5
5	2,11 \pm 0,01	2,17 \pm 0,03	-2,8
6	1,58 \pm 0,01	1,66 \pm 0,03	-5,1
7	1,74 \pm 0,01	1,18 \pm 0,01	-3,9
8	1,36 \pm 0,01	1,36 \pm 0,01	0

liche Abweichung der Mittelwerte liegt bei 2,6%. Keine der beiden Methoden jedoch ergab in jedem Versuch höhere Werte. Außerdem stimmen die AutoAnalyzerwerte besser überein (die Endpunkteinstellung bei der Handmethode erfolgt zum Schluß sehr zögernd

und ist schlecht vom Reaktions-Drift zu unterscheiden). Deshalb beruhen die Unterschiede wohl vornehmlich auf dem Meßfehler der Handbestimmung.

Diskussion

Da die chemischen Methoden zur Glycerinbestimmung zwar empfindlich, aber oft unspezifisch und zeitaufwendig sind (23), versuchten wir zwei häufig verwendete enzymatische Verfahren auf den AutoAnalyzer zu übertragen (12, 14).

Bei der Methode nach KREUTZ (14) muß vor Zugabe von GK der Reaktionsstillstand abgewartet werden. Da das AutoAnalyzer-System nur eine einmalige Messung einer Probe gestattet, würde das Ergebnis auf diese Weise durch unspezifische Reaktionen verfälscht. Dies zeigte ein Versuch mit 200 μ l Serum, das wir am AutoAnalyzer dialysierten und nach Vereinigung mit dem Reaktionsgemisch nach KREUTZ (14) ohne GK gemessen haben. Wir fanden vorgetäuschte Glycerinwerte von 1–4 mg/100 ml.

Bei der Methode nach WIELAND (12) dagegen ist das entstehende NADH₂ der Glycerinmenge direkt proportional, da im Blut α -Glycerophosphat nicht vorhanden ist (12). Allerdings ist hier das ungünstige Reaktionsgleichgewichts wegen Hydrazin nötig, das jedoch das Reaktionsgemisch instabil macht. Wir kontrollieren dies daher bei jedem Ansatz mit dem einfach zu handhabenden Vorversuch. Weiter wirkt sich die je nach Glycerinkonzentration unterschiedliche Reaktionszeit bis zur Endpunkteinstellung bei der manuellen Messung nachteilig aus. Bei den sehr kleinen Glycerinmengen, die am AutoAnalyzer letztlich gemessen werden, genügen jedoch die zur Verfügung stehenden Verweilzeiten. Durch die Dialyse fallen die die Fluoreszenzmessung störenden Bestandteile des Blutes weg und die Glycerinmenge wird um 50% erniedrigt. Nach Abbildung 4 ist die strenge Linearität bis 7,5 mg/100 ml gegeben, d. h. der tatsächliche Reaktionsendpunkt wird erreicht. Bei 10 und 15 mg/100 ml ist dies nur noch zu 70–80% der Fall, da die ursprüngliche Menge an GDH beibehalten wurde. Die Meßgenauigkeit am AutoAnalyzer berührt dies nicht, da bei hohen Glycerinkonzentrationen auch gleich hohe Standards mitgemessen werden. Bei Erhöhung der Enzymmenge wird auch hier der Endpunkt erreicht.

Die angegebenen 600 ml Reaktionsgemisch genügen zur Messung von 300 Blutproben von je 100 μ l, wobei jede Messung ohne Personal und Erstsanschaffung 0,60 DM, bei Erhöhung der Enzymmenge 0,75 DM kostet. Im Vergleich dazu betragen die Kosten einer Glycerinbestimmung mit der Boehringer-Testpackung oder mit der manuellen Methode nach WIELAND mit 200 μ l Serum etwa 1,20 DM.

Der mit dem beschriebenen Reaktionsgemisch meßbare Konzentrationsbereich des Glycerins beträgt bei 100 μ l Blut 0,2–15 mg/100 ml, mit 200 μ l Blut können noch 0,1 mg/100 ml gemessen werden. Die von EGGER und KREUTZ (24) angegebene untere Meßgrenze liegt

bei 0,04 mg/100 ml (bei 200 μ l Serum). Dazu ist eine exakte Ablesung von $E = 0,005$ nötig.

Dies gelang uns jedoch bei vorangegangenen manuellen Glycerinbestimmungen nach EGGSTEIN und KREUTZ (24) und Verwendung von Serum an Stelle von Glycerinlösungen wegen des stets auftretenden Reaktionsdrifts nicht. Die angegebene Umsatzrate von 20–40 Doppelbestimmungen pro Stunde pro Mitarbeiter konnten wir ebenfalls nicht erreichen, da die Warte-

zeiten bis zum Reaktionsstillstand vor Zugabe von GK meist länger als 10 Minuten waren.

Fräulein J. MESLE danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit.

Anmerkung bei der Korrektur

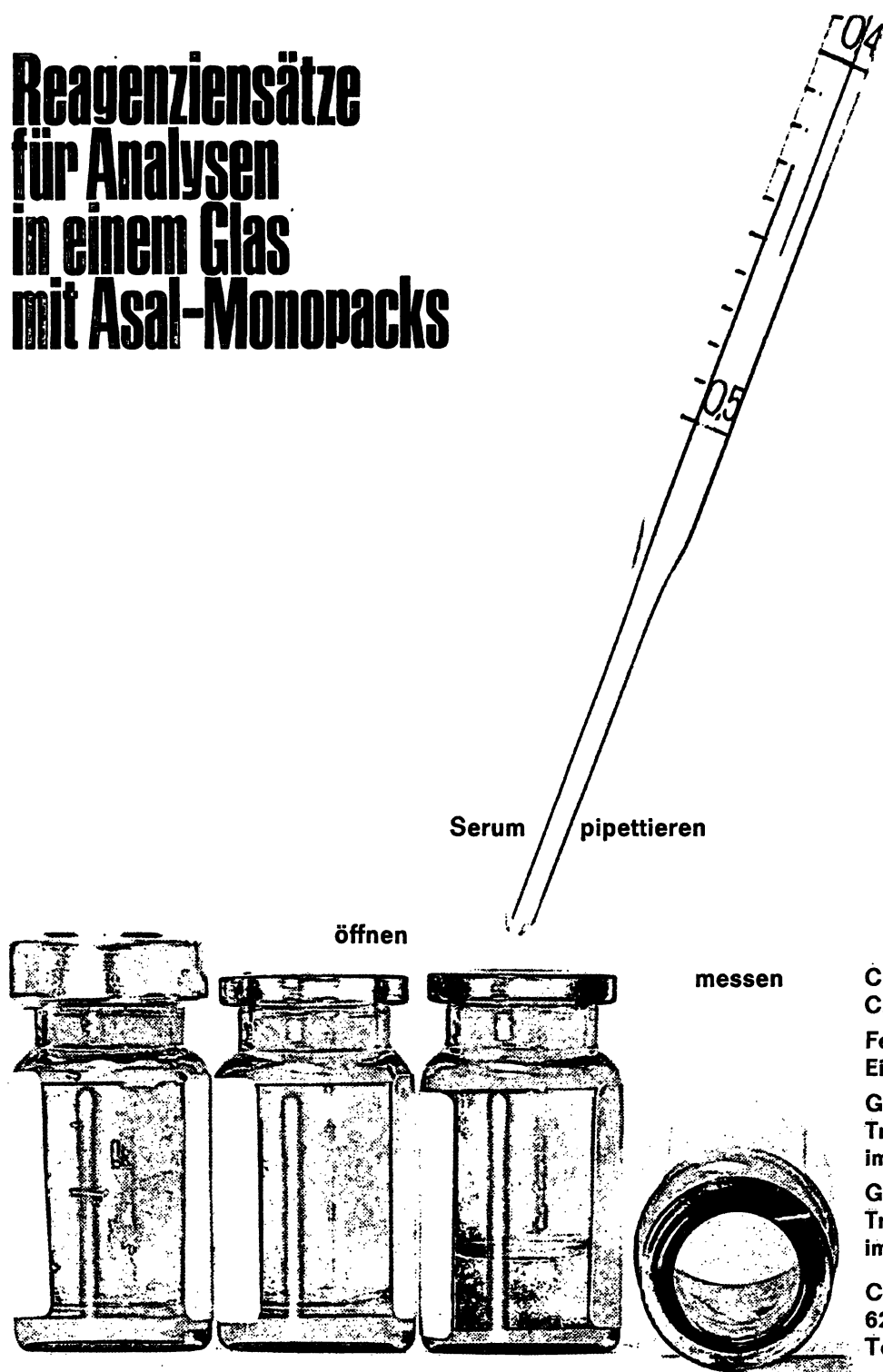
Infolge eines New Yorker Hafenarbeiterstreiks wurde uns erst nach Einsendung des Manuskripts eine Publikation mit gleichem Thema von H. KO und M. E. ROYER, *Analyt. Biochem.* 26, 18 (1968), bekannt. Wir glauben, daß unser Verfahren im Vergleich zu dem von KO und ROYER angegebenen wesentliche Vorteile aufweist.

Literatur

1. EGGSTEIN, M., *Wien klin. Wschr.* 79, 709 (1967). — 2. STEINBERG, D., in *Biochemical Society Symposia* 24 (1963), "The control of Lipid Metabolism", S. 111. — 3. LAMBERT, M. und A. C. NEISH, *Canad. J. Res.* 28, 83 (1950). — 4. HARVEY, S. C. und V. HIGHBY, *Arch. Biochem. Biophysics* 30, 14 (1951). — 5. KORN, E. D., *J. biol. Chemistry* 215, 1 (1955). — 6. BAILEY, M., *J. Laborat. clin. Med. S. Louis* 54, 158 (1959). — 7. MENDELSON, O. und A. ANTONIS, *J. Lipid Res.* 2, 45 (1961). — 8. McALOREN, J. T. und G. F. REYNOLDS, *Analyt. clin. Acta* 32, 170 (1965). — 9. LAURELL, S. und G. TIBBLING, *Clin. chim. Acta Amsterdam* 13, 317 (1966). — 10. PAYS, M., P. MALANGEAU und R. BOURDON, *Ann. pharmaceut. franc.* 15, 29 (1967). — 11. FREITAS, A. S. W. de, *Canad. J. Biochem.* 45, 1041 (1967). — 12. WIELAND, O., *Biochem. Z.* 329, 313 (1957). — 13. HAGEN, J. H. und P. B. HAGEN, *Canad. J. Biochem.* 40, 1129 (1962). — 14. KREUTZ, F. H., *Klin. Wschr.* 40, 362 (1962). — 15. GARLAND, P. B. und P. J. RANDLE, *Nature London* 196, 987 (1962). — 16. FRINGS, C. S. und H. L. PARDUE, *Analyt. clin. Acta*, 34, 228 (1966). — 17. SPINELLA, C. J. und M. MAGER, *J. Lipid Res.* 7, 167 (1966). — 18. PINTER, J. K., J. A. HAYASHI und J. A. WATSON, *Arch. Biochem. Biophysics* 121, 404 (1967). — 19. FAIN, J. N., N. REED und R. SAPERSTEIN, *J. biol. Chemistry* 242, 1887 (1967). — 20. KESSLER, G. und H. LEDERER in „Automation in Analytical Chemistry“, *Technicon Symposia*, 1965, S. 341. — 21. LOFLAND, H. B., *Analyt. Biochem.* 9, 393 (1964). — 22. ANTONIS, A., *J. Amer. Oil Chemist's Soc.* 44, 333 (1967). — 23. EGGSTEIN, M., *Klin. Wschr.* 44, 267 (1966). — 24. EGGSTEIN, M. und F. H. KREUTZ, *Klin. Wschr.* 44, 262 (1966).

Dr. Uwe Harding
Biochemische Forschungslaboratorien
der Fa. Dr. Karl Thomae GmbH
795 Biberach an der Riss

Reagenziensätze für Analysen in einem Glas mit Asal-Monopacks



ChE-Monopack
Cholinesterase im Serum
Ferro-Monopack
Eisen im Serum
GOT-Monopack
Transaminaseaktivität
im Serum
GPT-Monopack
Transaminaseaktivität
im Serum

Chemische Fabrik Asal
6231 Schwalbach/Taunus
Telefon (06196) 3031

ASAL

PRÄZISIONS-CHEMIKALIEN



Sigma freut sich,
die kompletteste Liste
cyclischer Nucleosidphosphate
anbieten zu können.

Alle sind in den Sigma-Laboratorien hergestellt.

cycl. Adenosin-2',3'-monophosphorsäure

Ammonium- oder andere Salze, je nach Vorrat

25 mg — 6,25 100 mg — 17,10 250 mg — 34,20 500 mg — 57,00 1 g — 95,00

cycl. Adenosin-3',5'-monophosphorsäure

kristallin, stimuliert unter anderem die Bildung von Phosphorylase

25 mg — 4,90 50 mg — 8,50 100 mg — 14,50 250 mg — 30,00 500 mg — 54,00 1 g — 93,50

cycl. Cytidin-2',3'-monophosphorsäure

Natriumsalz 95—99%

100 mg — 7,20 250 mg — 17,90 500 mg — 29,70 1 g — 49,50 5 g — 220,00

cycl. Cytidin-3',5'-monophosphorsäure

freie Säure, Reinheitsgrad I, etwa 98%

5 mg — 10,00 25 mg — 33,00 100 mg — 90,00 500 mg — 300,00 1 g — 500,00

N⁶-2'-O-Dibutyryl-adenosin-3',5'-monophosphorsäure, cycl.

5 mg — 3,00 25 mg — 10,00 100 mg — 26,75 250 mg — 55,00

cycl. Guanosin-2',3'-monophosphorsäure

Bariumsalz

100 mg — 8,50 250 mg — 19,50 500 mg — 36,00 1 g — 60,00

Mono-tributylaminsalz, etwa 98%, wasserlöslich

25 mg — 5,75 100 mg — 16,20 250 mg — 32,40 1 g — 90,00

cycl. Guanosin-3',5'-monophosphorsäure

Reinheitsgrad II, etwa 90%, Ammoniumsalz

5 mg — 7,00 25 mg — 24,00 100 mg — 67,50 1 g — 350,00

cycl. Thymidin-3',5'-monophosphorsäure

Reinheitsgrad I, etwa 98%, Natrium- oder Ammoniumsalz

5 mg — 7,50 25 mg — 24,50 100 mg — 67,50 500 mg — 225,00 1 g — 375,00

cycl. Uridin-2',3'-monophosphorsäure

Barium- oder Natriumsalz

100 mg — 8,40 500 mg — 30,00 1 g — 50,00

cycl. Uridin-3',5'-monophosphorsäure

Reinheitsgrad I, etwa 98%, Ammoniumsalz

5 mg — 5,00 25 mg — 16,50 100 mg — 45,00 500 mg — 150,00 1 g — 250,00

Sämtliche Preise sind in US-Dollars angegeben.

Sigma-Reagenzien sind in der ganzen Welt durch den Fachhandel oder direkt aus St. Louis beziehbar.

Telegramme: SIGMACHEM, St. Louis, Missouri

Die Forschungslaboratorien von

SIGMA CHEMICAL COMPANY

3500 DE KALB ST. • ST. LOUIS 63118, MO. • U.S.A.

MANUFACTURERS OF THE FINEST BIOCHEMICALS AVAILABLE

Vertretung in England:

SIGMA LONDON Chem. Co. Ltd. • 12, Lottice St., London S. W. 6 ENG. • Telephone: RENown-5823 (Rückberechnung)